

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 652 086**

②① N° d' nregistrem nt nati nal :

**89 12369**

⑤① Int Cl<sup>5</sup> : C 07 H 7/04; A 61 K 7/00, 31/70

⑫

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②② Date de dépôt : 20.09.89.

③⑦ Priorité :

⑦① Demandeur(s) : ANDARY Claude, Marie — FR.

⑦② Inventeur(s) : Andary Claude, Marie, Wyld Renée née  
Lachazette et Maury Luc.

④③ Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 22.03.91 Bulletin 91/12.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑦③ Titulaire(s) :

⑥① Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦④ Mandataire : Armengaud Jeune Cabinet Lepeudry.

⑤④ Composé nouveau d'origine végétale, dérivé de l'acide caféique, l'oraposide; composition à usage thérapeutique et composition dermato-cosmétique le contenant.

⑤⑦ L'invention concerne, à titre de composé nouveau, le dérivé de l'acide caféique ayant la formule suivante: O-  $\beta$ -D-(3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)-(4-O-caféoyl)-[(1,2)éthylidène-2'-e-(3",4"-dihydroxyphényl)-7-glucopyranoside et son procédé de préparation à partir de plantes ou de cellules de plantes.

L'invention concerne une composition à usage thérapeutique contenant ce composé, à titre de principe actif, applicable pour le traitement des affections nécessitant l'utilisation de piègeurs de radicaux libres.

L'invention concerne aussi une composition dermato-cosmétique contenant ce composé, sans addition de conservateur antimicrobien ni antioxydant, et destinée à protéger contre les réactions inflammatoires et le vieillissement dus aux U.V.

FR 2 652 086 - A1



La présente invention concerne un composé nouveau, l'oraposide, qui est un dérivé de l'acide caféique extrait de végétaux de la famille des Orobanchaceae, des compositions à usage thérapeutique contenant l'oraposide  
5 comme principe actif et des compositions dermato-cosmétiques le contenant.

Des études préliminaires du Demandeur et d'autres laboratoires avaient déjà révélé la présence de dérivés de l'acide caféique dans les extraits d'Orobanchacées, plantes  
10 phanérogames parasites sans chlorophylle (Andari et al. 1980, Il Farmaco, 1, 1-30; Bridel et Charaux, 1924, C.R. Acad. Sci. 178, 1839) mais leur structure n'était pas clairement établie.

L'intérêt pharmacologique de l'acide caféique (ou  
15 acide 3,4-dihydroxycinnamique) et de plusieurs dérivés naturels de celui-ci a déjà fait l'objet de nombreuses études. Ainsi Kimura et al. (Planta Medica, 1984, 473-477) ont étudié l'effet de divers tanins et en particulier de dérivés de l'acide caféique et caféoylquinique extraits de  
20 plantes de l'espèce Artemisia et ont montré leur effet inhibiteur sur la peroxydation des lipides dans les mitochondries et les microsomes de foie de rat. L'action inhibitrice de ces molécules sur les lipoxigénases participant au métabolisme des leucotriènes et de l'acide  
25 arachidonique et leur utilisation potentielle dans le traitement d'affections inflammatoires comme l'asthme ont aussi été publiées par Kimura et Okuda (J. of natural products, 1987, 50, 392-399).

L'activité de différents dérivés de tanins  
30 caféiques étant multiple et variable en fonction de leur structure, il est intéressant de rechercher de nouvelles molécules de cette famille, dans les plantes médicinales ou autres, et d'en chercher de nouvelles activités pharmacologiques ou des performances supérieures.

35 Ainsi le Demandeur a obtenu, à partir d'extraits de plantes de la famille des Orobanchaceae qui parasitent divers genêts (Cytisus scoparius et purgans) ainsi que des

plantes alimentaires comme les lentilles, les fèves, les solanées (tomates, aubergines...), un nouveau composé présentant des propriétés particulièrement intéressantes.

La substance extraite de l'Orobanche rapum-  
5 genistae a été obtenue à l'état pur et cristallisé, par exemple par macération alcoolique d'un extrait de plante ou de cellules de plante et soumise aux diverses analyses classiques permettant d'en établir la configuration moléculaire et la structure (séparations chromatographiques,  
10 détermination du point de fusion, études des spectres RMN, de masse, aux rayons X, IR et UV et diverses analyses biochimiques). La formule qui a été déduite de ces analyses est la suivante : O- $\beta$ -D-(3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)-(4-O-caféoyl)-[ (1,2)-éthylidène-2'-e-(3",4"-dihydroxyphényl)]-  
15 glucopyranoside.

Le Demandeur propose de l'appeler "oraposide".

L'effet hépatoprotecteur de l'acide caféique et d'autres polyphénols ayant déjà été décrit, l'effet de l'oraposide a été comparé à celui de molécules connues, vis-  
20 à-vis de molécules hépatotoxiques comme le nitroxynyl et le chloroforme, dans des tests in vitro. Deux marqueurs biochimiques d'hépatotoxicité ont été étudiés sur des hépatocytes de lapins :

- la libération de lactate déshydrogénase dans le milieu de  
25 culture des hépatocytes et son dosage,
- le dosage de la malonyldialdéhyde lors de la réaction de peroxydation des lipides dans les microsomes hépatiques.

L'effet hépatotoxique des produits utilisés étant probablement dû à la libération de radicaux libres, un  
30 "piégeur de radicaux libres" connu comme l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) a été utilisé comme référence dans les mêmes tests.

Le Demandeur a observé, avec surprise, que l'effet protecteur de l'oraposide, dans ces deux tests in vitro, est  
35 nettement supérieur à celui de l'acide caféique et de l' $\alpha$ -tocophérol.

La remarquable absence de toxicité des dérivés de

l'acide caféique tant per os que par injection ou par contact permet donc d'envisager de nombreuses applications pour la molécule de la présente invention.

Ainsi, la présente invention concerne également  
5 une composition à usage thérapeutique contenant comme principe actif une dose efficace d'oraposide, comprise de préférence entre 0,1 et 5 %, en association avec un excipient pharmaceutiquement inerte ou d'autres substances actives. Elle sera adaptée, en fonction de l'usage voulu, à  
10 une injection, à une administration orale ou à un traitement externe par voie topique.

La composition selon l'invention pourra être utilisée comme médicament pour le traitement des affections nécessitant des piègeurs de radicaux, en particulier les  
15 phénomènes inflammatoires, les intoxications des hépatocytes et le vieillissement cellulaire, surtout au niveau de la peau.

La présente invention concerne aussi une composition dermato-cosmétique contenant comme principe  
20 actif une dose efficace d'oraposide (de 0,1 à 5 %) et un excipient pharmaceutiquement inerte.

Le Demandeur a également mis en évidence des propriétés antibactériennes de l'oraposide. Ainsi la préparation dans laquelle sera utilisé ce composé pourra ne  
25 pas être additionnée d'agent conservateur antimicrobien.

De plus, les remarquables propriétés de l'oraposide comme inhibiteur de la peroxydation rendent inutile l'addition d'un agent protecteur du rancissement de l'excipient qui peut être de nature lipidique en dermato-  
30 cosmétique, le principe actif jouant lui-même ce rôle.

La composition dermato-cosmétique selon la présente invention devrait être particulièrement efficace dans la prévention du vieillissement de la peau et dans le traitement des états inflammatoires qui accompagnent souvent  
35 l'érythème solaire. En effet, on sait que dans certaines conditions métaboliques ou perturbations d'origine externe comme l'exposition aux rayons ultra-violets, la réduction de

l'oxygène est incomplète et aboutit à la formation de radicaux libres pouvant détériorer les phospholipides des membranes cellulaires. La production de radicaux libres entraîne diverses manifestations physiopathologiques qui  
5 participent au vieillissement cellulaire et peut-être à la cancérogénèse, aux phénomènes inflammatoires et au processus d'intoxication hépatique, ce qui justifie l'utilisation des hépatocytes comme système-modèle in vitro.

L'exemple suivant illustre l'invention sans  
10 toutefois en limiter la portée. Les 4 figures illustrent les résultats expérimentaux.

La figure 1 représente la structure de l'oraposide.

La figure 2 représente la quantité de LDH (lactate  
15 déshydrogénase) relarguée par  $4.10^6$  hépatocytes (culture de 8 jours) dans le milieu de culture, 3, 7, et 24 heures après traitement

1 = non traités,  
2 = traités au nitroxynyl  $10^{-4}$  M,  
20 4 = traités au nitroxynyl  $10^{-4}$  M et à l'oraposide  $5.10^{-5}$  M  
(3, 5, 6 = autres molécules testées).

La figure 3 représente la quantité de LDH (lactate  
24 heures) dans le milieu de culture, 3, 7, et 24 heures  
25 après traitement,

1 = non traités,  
2 = traités par le chloroforme  $10^{-4}$  M,  
3 = traités par le chloroforme  $10^{-4}$  M et l'oraposide à  
5.10<sup>-5</sup> M.

30 La figure 4a représente l'inhibition de la lipopéroxydation sur des microsomes hépatiques par différents composés phénoliques à  $5.10^{-5}$  M dans le milieu réactionnel :

1 = témoin sans composé phénolique,  
35 3 = oraposide  
10 = acide caféique,  
11 =  $\alpha$ -tocophérol,

(2, 4 à 9 autres molécules testées).

La figure 4b représente l'inhibition de la lipopéroxydation par l'oraposide à différentes concentrations sur des microsomes hépatiques de lapin :

- 5 1 = témoin sans oraposide,  
2 =  $5 \cdot 10^{-5}$  M  
3 =  $10^{-5}$  M  
4 =  $5 \cdot 10^{-6}$  M  
5 =  $2 \cdot 10^{-6}$  M  
10 6 =  $10^{-6}$  M.

#### EXEMPLE

A. Préparation de l'extrait végétal, purification des cristaux, analyse et établissement de la formule de l'oraposide.

15 Le matériau de départ est de la poudre de plante (Orobanche) dégraissée à l'éther de pétrole. Cette poudre est mise à macérer dans de l'éthanol à 80 % ou du méthanol à 80 %, à raison de 10 l pour 400 g de poudre de plante, à 50°C.

20 Cette macération alcoolique, après filtration, est additionnée rapidement de 20 ml d'une solution aqueuse fraîchement préparée de métabisulfite de sodium à 10%. A la suite d'un repos d'une nuit à 4°C cet extrait est filtré puis concentré de manière à chasser l'alcool. L'extrait  
25 devenu aqueux subit un dégraissage définitif par un mélange : éther éthylique débarrassé des peroxydes - éther de pétrole (3 : 1). Cet extrait dégraissé est épuisé par 20 litres d'acétate d'éthyle (redistillé sur chlorure de calcium). Les phases "acétate d'éthyle" sont desséchées par du sulfate de  
30 sodium (pur, sec), puis réunies et évaporées à sec sous vide. Le résidu poudreux obtenu, de couleur blanc-crème, est dissout dans de l'eau chaude et la solution est mise à cristalliser à la température ambiante puis à +4°C.

Ces cristaux sont essorés et remis en solution à  
35 chaud dans un mélange éthanol 5 % - eau 95 % puis recristallisés à froid. L'opération est répétée plusieurs fois.

Le composant obtenu à l'état de cristaux purs est soumis à diverses analyses classiques, biochimiques et chimico-physiques (séparation chromatographique, détermination du point de fusion, étude des spectres RMN, de masse, aux rayons X, IR et UV) pour déterminer sa structure. L'analyse des résultats donne la formule suivante : O- $\beta$ -D-(3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)-(4-O-caféoyl)-[(1,2)-éthylidène-2'-e-(3",4"-dihydroxyphényl)]-glucopyranoside.

Sa structure après étude aux rayons X est représentée dans la figure 1.

B. Etude in vitro des propriétés de l'oraposide pour la protection des hépatocytes de lapins en culture.

Le modèle expérimental choisi est l'étude de la libération de lactate déshydrogénase (LDH) par les hépatocytes de lapin en culture primaire, cette libération de LDH représentant un marqueur de dégradation des hépatocytes.

Les hépatocytes sont volontairement intoxiqués au nitroxynyl ( $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  M) ou au chloroforme (de  $10^{-3}$  à  $10^{-5}$  M).

L'effet de l'oraposide est évalué pour une concentration de 0,05 mM final dans le milieu de culture.

La figure 2 montre que l'oraposide diminue très significativement le relargage de LDH par les hépatocytes intoxiqués au nitroxynyl et la figure 3 montre un effet moins net sur les cellules traitées au chloroforme mais celui-ci a un effet moins toxique.

L'oraposide par lui-même ne présente aucune toxicité cellulaire, même à une concentration de 100  $\mu$ M.

C. Etude in vitro de l'inhibition de la lipoperoxydation à partir des microsomes hépatiques de lapin.

Une réaction de lipoperoxydation se produit lorsqu'on incube des microsomes hépatiques de lapin en présence de NADPH.

Les microsomes sont récupérés après traitement des hépatocytes aux ultra-sons.

La lipoperoxydation est évaluée par la formation

de malonyldialdéhyde selon la méthode de Placer et al. (1966, Analyt. Biochem. 16, 359-364).

La réaction est effectuée en absence (témoin) et en présence d'acide caféique ou d'oraposide à la concentration de  $5.10^{-5}$  M ou en présence d' $\alpha$ -tocophérol (Sigma)  $5.10^{-5}$  M (référence d'activité inhibitrice connue).

La figure 4a montre clairement que l'acide caféique et l' $\alpha$ -tocophérol ont une activité inhibitrice équivalente et que l'oraposide assure une inhibition plus forte (100 %).

La dose d'oraposide nécessaire pour obtenir une inhibition de 50 % est de  $10^{-5}$  M (figure 4b).

De plus il est possible de potentialiser l'oxydation des lipides membranaires par des générateurs de radicaux libres ( $\text{CCl}_4$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ; dans ces conditions l'inhibition par l'oraposide est de 100 % avec le  $\text{CCl}_4$  et de 90 % avec l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### D. Mise en évidence d'une activité antibactérienne.

On sait qu'un certain nombre de dérivés de l'acide caféique inhibent la multiplication des bactéries. Cette propriété a été confirmée pour l'oraposide sur 40 souches différentes, appartenant à 10 genres de bactéries.

On observe 100 % d'inhibition de toutes les souches dès la dose de 0,5 mg/ml.

Une étude plus détaillée réalisée avec 29 souches de *Staphylococcus aureus* montre une inhibition de 70 % dès la concentration 0,06 mg/ml et de 80 % à 0,12 mg/ml.

30

35



## REVENDICATIONS

1.- A titre de composé nouveau, le dérivé de l'acide caféique ayant la formule suivante : O- $\beta$ -D-(3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)-(4-O-caféoyl)-[ (1,2)-éthylidène-2'-e-(3",4"-dihydroxyphényl)]-glucopyranoside.

2.- Procédé de préparation du composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on soumet un extrait de plante ou de cellules de plante à une macération alcoolique.

3.- Composition à usage thérapeutique caractérisée en ce qu'elle contient une dose efficace du composé selon la revendication 1.

4.- Composition à usage thérapeutique selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle contient de 0,1 à 5 % du composé selon la revendication 1.

5.- Composition à usage thérapeutique selon la revendication 3 ou 4, caractérisée en ce qu'elle contient un excipient pharmaceutiquement inerte approprié à une administration par voie orale, parentérale ou topique.

6.- Utilisation du composé selon la revendication 1 pour la préparation d'un médicament pour le traitement des affections nécessitant l'utilisation de piègeurs de radicaux libres.

7.- Composition dermato-cosmétique caractérisée en ce qu'elle contient une dose efficace du composé selon la revendication 1.

8.- Composition dermato-cosmétique selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle contient de 0,1 à 5 % du composé selon la revendication 1.

9.- Composition dermato-cosmétique selon la revendication 7 ou 8, caractérisée en ce qu'elle n'est pas additionnée d'agents conservateurs antibactériens ou antifongiques.

10.- Composition dermato-cosmétique selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisée en ce qu'elle n'est pas additionnée d'agents conservateurs antioxydants.

11.- Composition dermato-cosmétique selon l'une  
quelconque des revendications 7 à 10, caractérisée en ce  
qu'elle a un effet protecteur contre les réactions  
inflammatoires et le vieillissement cellulaire dus à la  
5 libération de radicaux libres provoqués par l'exposition aux  
rayons ultra-violets ou autres générateurs de radicaux  
libres.

10

15

20

25

30

35

1/3

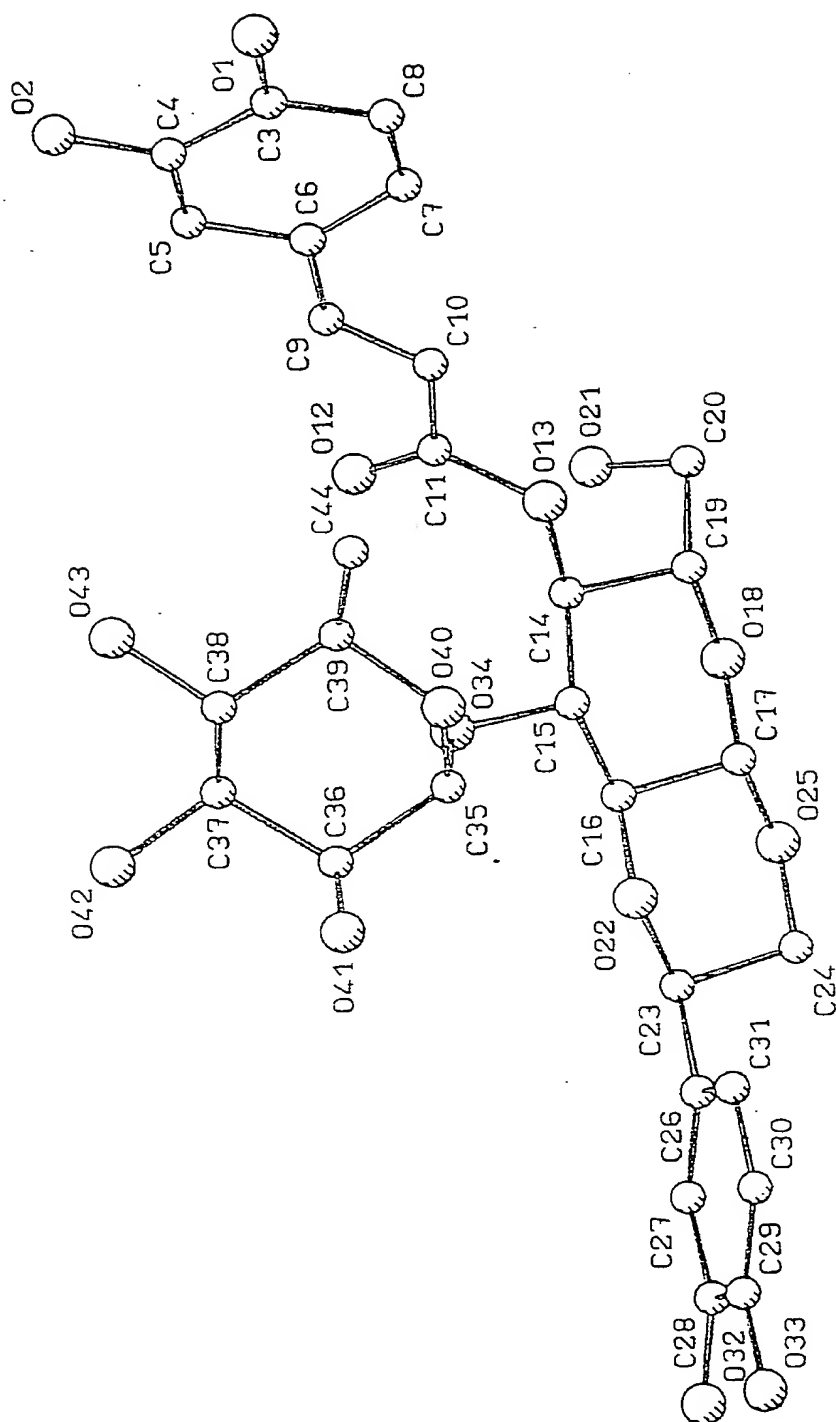


Figure 1

2/3

Figure 2

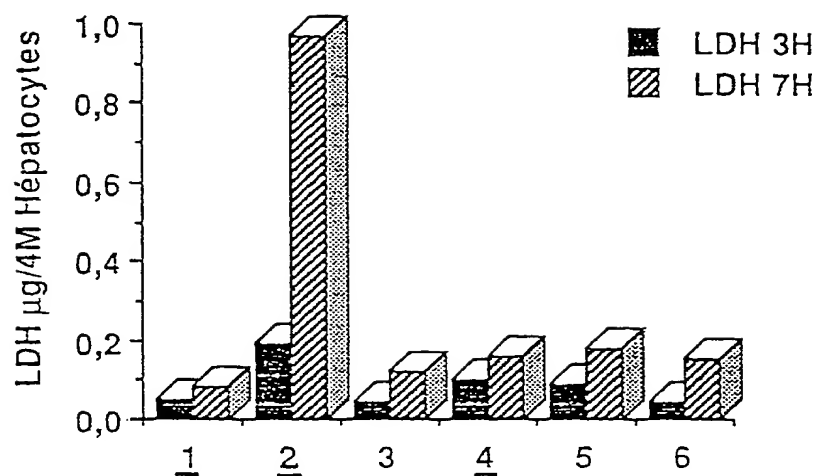
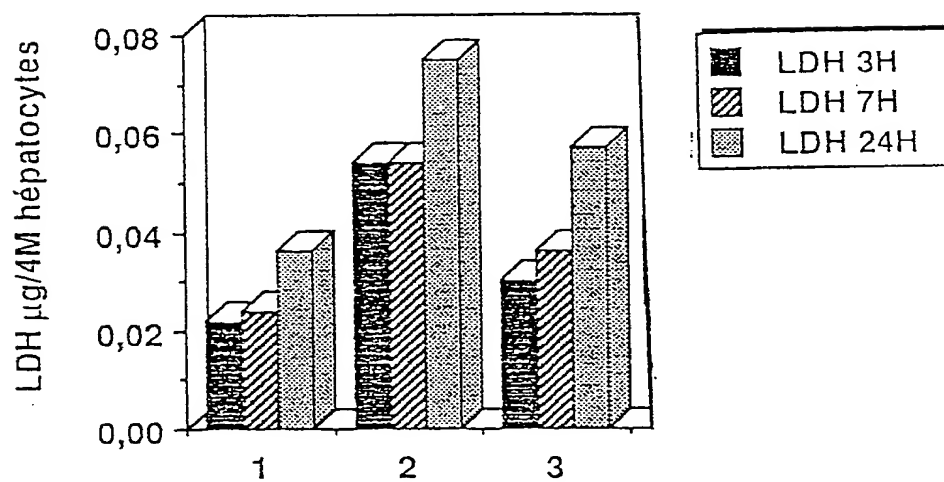


Figure 3



3/3

Figure 4a

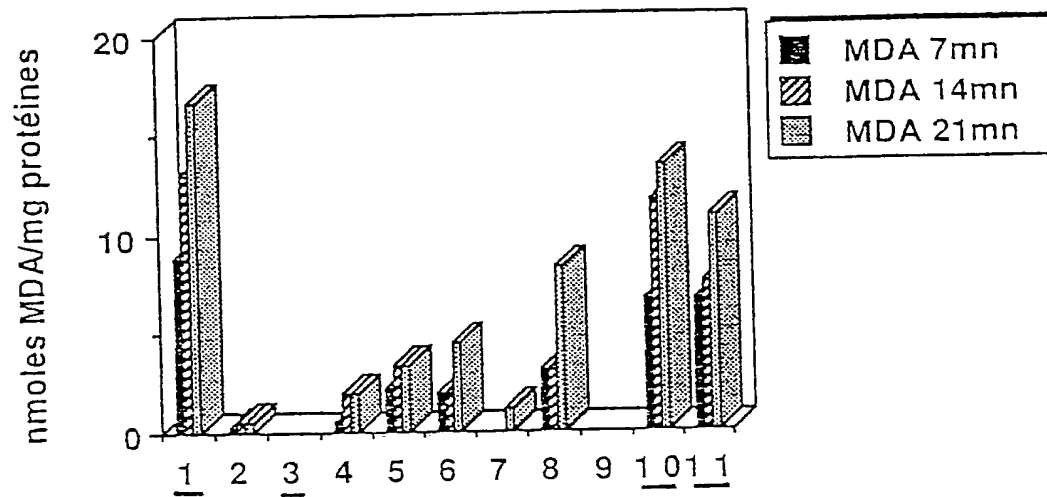
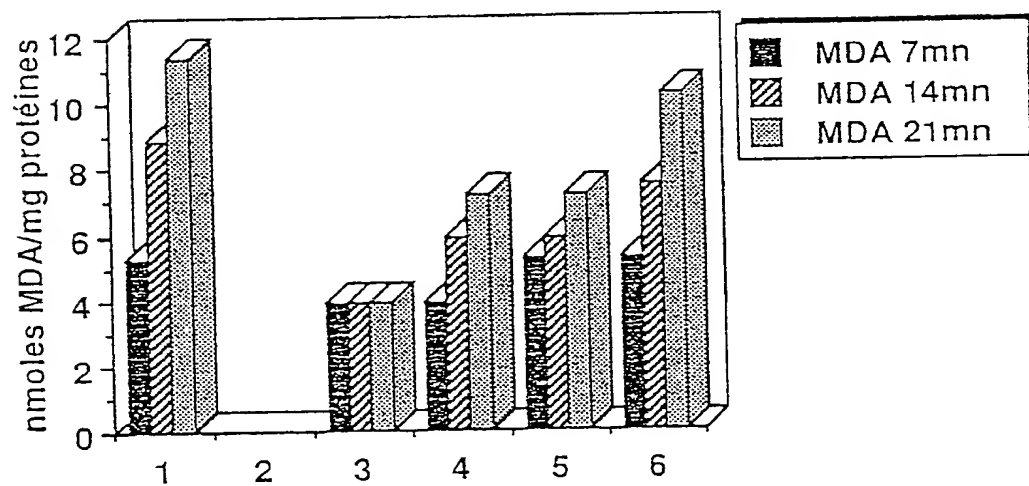


Figure 4b



INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheFR 8912369  
FA 431691

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	FR-A-2 314 725 (S.C.R.E.E.N.) * Revendications 1-11 * ---	1,3
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 106, no. 19, mai 1987, page 574, abrégé no. 155103s, Columbus, Ohio, US; & JP-A-61 291 525 (OSAKA YAKUHI KENKYUSHO K.K.) 22-12-1986 * Abrégé * ---	1,3,6
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 107, no. 6, 10 août 1987, page 407, abrégé no. 46141c, Columbus, Ohio, US; S. KITAGAWA et al.: "Studies on the Chinese crude drug "Forsythiae Fructus". VIII. On isolation of phenylpropanoid glycosides from fruits of Forsythia koreana and their antibacterial activity", & YAKUGAKU ZASSHI 1987, 107(4), 274-8 * Abrégé * ---	1,3,6
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 107, no. 7, 17 août 1987, page 37, abrégé no. 51592e, Columbus, Ohio, US; Y. KIMURA et al.: "Effects of caffeoylglycosides on arachidonate metabolism in leukocytes", & PLANTA MED. 1987, 53(2), 148-53 * Abrégé * -----	1,3,6
		<b>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)</b>  C 07 H 15/00 C 07 H 9/00 A 61 K 31/00
Date d'achèvement de la recherche 05-06-1990		Examineur BRENNAN J.
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire  T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant		

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)